

ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE TIAZOLIDINONAS SINTÉTICAS EM LINHAGEM DE GLIOMA C6

**TAÍSE ROSA DE CARVALHO¹; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA²; ELITA
FERREIRA DA SILVEIRA²; WILSON CUNICO²; ELIZANDRA BRAGANHOL³**

¹Universidade Federal de Pelotas – taisecarvalho_@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julianahazambuja@hotmail.com

²Universidade Federal de Rio Grande – elitafs24@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - wjcunico@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – elizbraganhol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores que acometem o sistema nervoso central e compartilham semelhanças morfológicas com células gliais. Tais tumores podem ser classificados de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações genéticas e essa classificação varia de lesões de grau I a IV, sendo a lesão de grau IV a mais agressiva e também conhecida como glioblastoma multiforme (LOUIS et al, 2007). O glioblastoma multiforme (GBM) constitui a forma mais comum e agressiva de tumor cerebral, com grande capacidade de infiltração, proliferação e de resistência ao tratamento (HOLLAND, 2001).

O tratamento utilizado no glioblastoma multiforme envolve ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia quando possível, porém o prognóstico dos pacientes permanece extremamente ruim, com sobrevida média de 12 meses após o diagnóstico (STUPP et al, 2007). Portanto investigar novas alternativas terapêuticas que possam auxiliar no tratamento dos pacientes se faz necessário.

A classe de heterociclos das tiazolidinonas possui importantes atividades biológicas já demonstradas na literatura. Essa classe possui atividade anti-inflamatória e antitumoral já descritas (JAIN et al., 2012), o que as tornam uma opção de potencial terapêutico interessante, visto que um microambiente inflamatório pode ser responsável por favorecer a progressão tumoral (LEIBOVICH-RIVKIN et al., 2014). Além disso, por possuírem um perfil lipofílico, essa classe poderia ser capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, característica desejável para uma terapia que tem como alvo células tumorais localizadas na massa cerebral.

O objetivo desse trabalho foi, portanto, determinar a atividade antitumoral de uma série de tiazolidinonas em linhagem celular de glioma C6 e ainda avaliar a atividade citotóxica das moléculas mais promissoras nas células análogas normais, os astrócitos.

2. METODOLOGIA

As tiazolidinonas testadas foram sintetizadas no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos da UFPel a partir de reações multicomponentes entre benzaldeídos substituídos, 2-aminoetilpiperidina e ácido mercaptoacético sob refluxo

de tolueno. A estrutura química de cada composto varia de acordo com o aldeído utilizado.

A linhagem de glioma C6 obtida da American Type Culture Collection (ATCC) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂.

Após atingirem uma confluência de aproximadamente 90% dentro das garrafas de cultivo, as células foram tripsinizadas e posteriormente semeadas em placas de 96 poços (5x10³ por poço). As células foram mantidas na incubadora por 24h e então expostas ao tratamento por 48h com as tiazolidinonas (4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 4H, 4I, 4J, 4K, 4L, 4M, 4N, 4O e 4P na concentração de 100 µM); DMSO, solvente das moléculas, foi utilizado como controle.

Após selecionadas as 4 moléculas mais promissoras, foi realizado o teste de citotoxicidade, utilizando cultura primária de astrócitos para o tratamento. Seguindo o protocolo descrito por Gottfried, os astrócitos foram semeados em placas de 96 poços (5x10⁴ células por poço). As placas foram então tratadas com as tiazolidinonas selecionadas, na concentração de 100 µM.

Ao final de ambos ensaios, a viabilidade celular foi determinada pelo teste do MTT. Este método consiste na medida do número de células com a mitocôndria metabolicamente ativa, baseando-se na redução do sal tetrazolium (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) à formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 492 nm. A absorbância é linearmente proporcional ao número de células com as mitocôndrias ativas, indicando quantas células viáveis restaram ao final do tratamento.

Foram realizados 3 experimentos independentes com cada tipo celular e para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido do post-hoc de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes do controle para um $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as tiazolidinonas testadas na concentração de 100 µM reduziram de forma significativa a viabilidade celular de glioma C6 em relação a células que não receberam tratamento (controle DMSO). As moléculas 4A e 4G foram capazes de reduzir em aproximadamente 50% a viabilidade das células tumorais (Tabela 1), efeito similar foi encontrado na molécula 4O (Tabela 2). A molécula 4D apresentou uma redução de viabilidade celular de 55% em relação ao controle (Tabela 1). As moléculas 4I, 4L, 4M e 4P também conseguiram reduzir a viabilidade celular em 53%, 54%, 75%, 73% respectivamente em células de glioma C6 (Tabela 2), mostrando-se, juntamente à molécula 4D (Tabela 1), as estruturas de maior potencial antitumoral.

Tabela 1. Análise da viabilidade celular de cultura de glioma C6 tratada com tiazolidinonas 4A à 4H na concentração de 100 μ M

Grupo	DMSO	4A	4B	4C	4D	4E	4F	4G	4H
		***		**	***	**		***	**
C6 48h	100%	51,0%	78,2%	62,4%	45,2%	60,2%	71,5%	53,9%	59,0%

Porcentagem de viabilidade em relação ao controle após 48h de tratamento. *diferença significativa em relação ao controle para $P \leq 0,05$.

Tabela 2. Análise da viabilidade celular de cultura de glioma C6 tratada com tiazolidinonas 4I à 4P na concentração de 100 μ M .

Grupo	DMSO	4I	4J	4K	4L	4M	4N	4O	4P
		***	*		***	***	*	***	***
C6 48h	100%	47,0%	64,0%	70,2%	46,3%	35,6%	64,9%	51,1	37,86

Porcentagem de viabilidade em relação ao controle após 48h de tratamento. *diferença significativa em relação ao controle para $P \leq 0,05$.

As moléculas com atividade antitumoral mais promissoras (4D,4L,4M e 4P) foram testadas em cultura primária de astrócitos também na concentração de 100 μ M. Em relação ao controle DMSO, a molécula 4P reduziu apenas 6,2% da viabilidade celular nessas células, não sendo uma redução estatisticamente significativa em relação ao controle, indicando que a molécula 4P apresenta baixo poder de toxicidade em relação aos astrócitos. As moléculas 4D, 4L e 4M aumentaram em, respectivamente, 7,6%, 9,7% e 8,6% a viabilidade celular em astrócitos, demonstrando que estas moléculas não possuem efeitos tóxicos para estas células.

Por não reduzirem de forma significativa a viabilidade de astrócitos, as tiazolidinonas mostraram ser seletivas para células tumorais, característica desejada para uma molécula com potencial anti-tumoral. As tiazolodionas, portanto, possuem baixo potencial de toxicidade para células saudáveis, e promissor potencial citotóxico para células de glioma C6, agindo seletivamente nas células tumorais.

4. CONCLUSÕES

Considerando que o glioma ainda não apresenta um tratamento totalmente efetivo, o efeito antitumoral apresentado por essa classe de moléculas pode representar uma nova alternativa terapêutica para os pacientes, podendo ser utilizado em combinação com a quimioterapia padrão. Mais estudos *in vitro* e *in vivo* se mostram necessários a fim de validar a efetividade das tiazolidinonas como opção de tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LOUIS, D.N; et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v.114, n.2, p.97-109, 2007

HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. **Curr Opin Neurol**, v.14, n6, p.683-8. 2001.

STUPP, R; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **Seminars in Oncology**, 30(6 Suppl 19), p. 10-4, 2003

JAIN, A.K.; et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. La Jolla, v. 20, n.11, p.3378–3395, 2012.

LEIBOVICH-RIVKIN, T; et al. The inflammatory cytokine TNF α cooperates with Ras in elevating metastasis and turns WT-Ras to a tumor promoting entity in MCF-7 cells. **BMCCancer**. London, v. 14, n.1, 2014

GORRFRIED, C; et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**. V. 833, n.2, p 142-149, 1999